

EBウイルス膜蛋白質LMP1によるIL-8誘導と 上咽頭癌血管新生に関する研究

金沢大学大学院医学系研究科脳医科学専攻感覚運動病態学

(旧講座名：耳鼻咽喉科学)

(主任：古川 勉教授)

任 慶 春

上咽頭癌 (Nasopharyngeal carcinoma, NPC) における血管新生誘導機構に対する Epstein-Barr ウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) 遺伝子の関与について検討した。NPC 原発巣生検標本 37 例を対象として、抗フォン・ウィルブラント因子 (von Willebrand factor, vWF) 抗体を用いた免疫組織化学染色により腫瘍組織の微小血管内皮細胞を染色、微小血管数を計測し、腫瘍血管新生の指標とした。同じ標本において EBV がコードする膜蛋白質 (latent membrane protein 1, LMP1) への抗体および血管新生促進因子であるインターロイキン (interleukin, IL) -8 への抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。発現の陽性率をスコア化し、発現の相関および微小血管数との相関を調べた。腫瘍微小血管数と LMP1 の発現 ($r = 0.605$, $P < 0.0001$), IL-8 ($r = 0.449$, $P = 0.0053$) の発現との間に有意な正の相関を認めた。さらに、LMP1 の発現と IL-8 の発現との間に有意な正の相関も認めた ($r = 0.712$, $P < 0.0001$)。また、NPC のモデルである NPC-KT 細胞から限界希釈法を用いて、EBV 陽性クローンおよび陰性クローンを分離し、RT-PCR 法により EBV 陽性クローンにおける IL-8 mRNA の発現は陰性クローンに比較して増加していることが判明した。さらに、IL-8 プロモーターのルシフェラーゼレポータープラスミド (pGL3-IL-8) を EBV 陽性クローンおよび陰性クローンに形質導入し、ルシフェラーゼアッセイで調べたところ、EBV 陽性クローンにおける IL-8 プロモーター活性は陰性クローンにおける IL-8 プロモーター活性より 8 倍上昇していることが判明した。EBV の遺伝子産物のどれが IL-8 を誘導するかを調べるため、pcDNA3 ベクター (陰性コントロール), EBV 核抗原 (EBV-determined nuclear antigen, EBNA) 1 を含む pCEP4 ベクター, EBV 核内小 RNA (EBV encoded small RNAs, EBERs) および LMP1 の発現プラスミドそれぞれを pGL3-IL-8 プラスミドと共に細胞に発現させ、ルシフェラーゼアッセイを行った。LMP1 による IL-8 プロモーターの活性は 293 細胞でベクターコントロールの 12 倍、EBV 陰性 NPC-KT 細胞クローンでベクターコントロールの 20 倍増加していた。一方、pcDNA3 ベクター, EBNA1 および EBERs の発現では IL-8 プロモーターの活性化がおこらなかった。さらに、IL-8 プロモーターの上流にある NF- κ B 結合領域および AP-1 結合領域の変異体を作製し、それぞれを LMP1 と共に C33A 細胞に導入し、LMP1 の作用ドメインをルシフェラーゼアッセイにより検討した。NF- κ B 結合領域の変異体では IL-8 プロモーターの活性は完全に阻害され、AP-1 領域の変異体では IL-8 プロモーター活性は部分的に阻害された。以上の結果から、NPC において EBV にコードされる LMP1 が IL-8 の発現を誘導して血管新生を誘導すること、そして LMP1 による IL-8 誘導には IL-8 プロモーター上流の NF- κ B 結合領域が必要不可欠であることが示唆された。

Key words angiogenesis, Epstein-Barr virus related genes, interleukin-8, NPC-KT, nasopharyngeal carcinoma

Epstein-Barr ウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) はバーキットリンパ腫 (Burkitt's lymphoma) から発現されたヒト γ ヘルペスウイルス (Herpes virus) である¹⁾。上咽頭癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) における EBV 抗体価の上昇および NPC 組織標本内の EBV ゲノムの存在などが証明され、NPC と EBV との病因論的関連が明らかとなった^{2,3)}。EBV は一般に、ヒト腫瘍においては 3 種類の潜伏感染様式を呈する (表 1)。そのうち、NPC は II 型に属し、EBV にコードされる核抗原 (EBV-

determined nuclear antigen, EBNA) 1, 潜伏膜蛋白質 (latent membrane protein, LMP) 1 および LMP2 の 3 種類のウイルス蛋白と EBV にコードされる核内小 RNA (EBV encoded small RNA, EBER) という 2 種類の核内小 RNA (EBER1, 2) の発現が認められる。これらのウイルス蛋白および核酸の中でも LMP1 は、NPC の発癌の過程に関与するのみでなく、接着因子 E-カドヘリンの発現低下、マトリックス分解酵素 (matrix metalloproteinase, MMP) 9 の発現誘導、細胞運動能亢進などに

平成 14 年 1 月 9 日受付, 平成 14 年 3 月 1 日受理

Abbreviations : ABC, avidin biotin peroxidase complex; AP-1, activator protein-1; bFGF, basic fibroblast growth factor; EBERs, EBV encoded small RNAs; EBNA, EBV-determined nuclear antigen; EBV, Epstein-Barr virus; FBS, fetal bovine serum; IL, interleukin; LMP, latent membrane protein; ISH, *in situ* hybridization; MMP, matrix

Table 1. EBV-related human carcinoma and expression of EBV genes

EBV gene	Type I	Type II	Type III
EBNA1	+	+	+
EBNA2	—	—	+
EBNA3A	—	—	+
EBNA3B	—	—	+
EBNA3C	—	—	+
EBNA-LP	—	—	+
LMP1	—	+/-	+
LMP2A	—	+	+
LMP2B	—	+	+
BARF0	+	+	+
EBERs	+	+	+
EBV-related disease	Burkitt's lymphoma Gastric carcinoma	NPC T-lymphoma Hodgkin disease	Transformed B cells

より浸潤転移を促進することが報告されている^{4)~7)}。

ところで血管新生 (angiogenesis) は腫瘍の増殖に必須の現象である⁸⁾⁹⁾。乳癌、脳腫瘍および腸癌などのヒト悪性腫瘍において、血管新生能と浸潤転移能との間には正の相関が報告されている^{10)~13)}。これまでに多数の血管新生促進因子が報告されているが¹⁴⁾、その中でも、血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、インターロイキン (interleukin, IL)-8は、腫瘍組織におけるそれらの発現と腫瘍の浸潤転移能との関連が一般に認められている血管新生促進因子である。NPCの組織におけるEBV遺伝子発現と血管新生促進因子発現に関する免疫組織化学的検討から、LMP1の発現はNPC微小血管数にもっとも影響を与える因子であることを脇坂が報告している¹⁵⁾。さらにVEGF, bFGF, および形質変換増殖因子 α (transforming growth factor- α) の発現とEBV遺伝子の発現についても検討されたが、LMP1の発現はいずれの血管新生促進因子の発現とも有意な相関があることが示されている。しかし、LMP1を媒介する血管新生促進因子の発現機構については言及されていない。

IL-8は白血球走化因子として単離されたポリペプチドであり、血管新生促進因子でもある。内皮細胞に直接作用し、増殖、遊走を促進する。近年、LMP1は試験管内でIL-6やIL-8を誘導することが報告された¹⁶⁾。一方で、一般的なウイルス感染においても、IL-8を含む炎症性サイトカインが誘導されるが、その誘導機構にはLMP1以外の因子が関与している可能性もある。

そこで、NPCにおけるEBV遺伝子の発現と血管新生促進因子IL-8の発現との関連性について解明することを目的として本研究を遂行した。

材料および方法

I. 免疫組織化学染色

アビジン-ビオチン染色 (avidin biotin peroxidase complex,

ABC) 法に準じて行った¹⁷⁾。ホルマリン固定、パラフィン包埋した37例のNPC原発巣生検標本から4 mm厚さで凍結切片を作製した。100%エタノールで固定し、0.3% H₂O₂加メタノールを用いて内因性ペルオキシダーゼ阻止を行った。非特異反応は正常ヤギ血清 (DAKO, Copenhagen, Denmark) でブロックした。そして、1:50の抗LMP-1 (CS1-4, DAKO), 1:200の抗IL-8 (RS0002-08, R & D Systems, Inc, Minneapolis, USA), 1:200の抗フォン・ウィルブランド因子 (von Willebrand factor, vWF) (A0082, DAKO, 京都) の一次抗体それぞれを4℃一晩で反応させた後、PBS (PH 7.4) で5分間3回洗浄した。ビオチン化ヤギ抗ウサギIgG二次抗体 (Research Genetics, Huntsville, USA) を30分間室温で反応させた後、同様PBSで洗浄した。ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Strept ABC Complex, DAKO) と30分間室温で反応させた後、PBSで洗浄した後、0.0006%過酸化水素加0.05%ジアミノベンチジン (diaminobenzidine, DAB) (同仁化学研究所, 熊本) で5-10分間発色反応させた。メチルグリーンを用いて核染色を行った。vWF, LMP1陽性コントロールには、以前本教室で同発現を確認したものを利用した^{18)~19)}。IL-8の陽性コントロールにはヒト胎盤切片を用いた。非免疫マウスIgG (DAKO) を一次抗体の代わりに用いて陰性コントロールとした。腫瘍細胞の一部でも特異的免疫反応性が見られたものを陽性、全く特異的反応性が認められないものを陰性とした。光学顕微鏡 (×200) で全腫瘍細胞に対して免疫反応陽性の腫瘍細胞の割合が最も多いと思われる3カ所に全腫瘍細胞に対する免疫反応陽性細胞の比を算出し、さらにその平均値を算出して、それに100を乗じて百分率で示し、その免疫反応陽性率とした。10%以下のものをスコア1, 20%以下のものをスコア2, 30%未満のものをスコア3, とするようにして0から9までのスコアを与えた。100%陽性のものをスコア10にした。

II. 微小血管計数

Roychowdhuryら²⁰⁾、脇坂¹⁵⁾の微小血管計数法に準じて行っ

た。免疫組織染色で使用した標本の連続切片に抗vWF抗体を用いて微小血管を染色した。光学顕微鏡(×10)で腫瘍内に血管数が最も多いと思われる部位を確定し、光学顕微鏡(×400)で3カ所の血管の数を計測して、それを血管新生の指標とした。

Ⅲ. 細胞培養、発現ベクターの作製および培養細胞への遺伝子導入

本教室で樹立したNPCモデル細胞株NPC-KT細胞²¹⁾、およびヒト子宮癌細胞由来C33A細胞株は5%ウシ胎仔血清(fetal bovine serum, FBS), カナマイシン(0.2 mg/ml)を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)を用いて37℃, 5% CO₂, 加湿下で培養を行った。ヒト腎臓上皮細胞由来293細胞株は10%ウシ胎仔血清を加えたDMEMで培養を行った。

LMP1の発現ベクターpcDNA3-LMP1は文献⁹⁾で示したものを使用した。707 bpのEBERs断片をPCR(5'-TTGGATCCCATTAAGCCTAGGGTGTA-3', 5'-TTAGATCTCCCTTTACATGTTGTGGGTG-3')のプライマーを用いたでNPC-KT細胞DNAから増幅し、EBVの複製オリジン(oriP)とEBNA1を含み、種々の真核細胞で染色体外複製ができる外来遺伝子発現用ベクターpCEP4の制限酵素Sma I切断部位にサブクローニングした。169 bpのIL-8プロモーターはヒト細胞ゲノムDNAからPCR(5'-TTAGATCTGTGATGACTCAGGTTTGCCCTG-3', 5'-GTCCCTAGAA GCTTGTGTGCTCTGCTG-3')のプライマーを用いたで増幅し、ホタルルシフェラーゼレポーターベクターであるpGL₃-Basic (Promega, Madison, USA)のホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流にあるXho IとHind IIIサイトにサブクローニングした²²⁾。また、ODA-LA-PCR (Takara, 大津)を用いてIL-8プロモーター上のNF-κB結合配列をTGGAATTTCCからTTAACTTTCCに変換した変異体(NF-κBmut)およびAP-1結合配列をTGAGTCAからTGATATCに変換した変異体(AP-1mut)を作製し、それぞれをpGL₃-Basicベクターのルシフェラーゼ遺伝子の上流にあるXho IとHind IIIサイトにサブクローニングした。

遺伝子導入はリン酸カルシウム沈殿法を用いた。293細胞、C33A細胞またはEBV陰性NPC-KT細胞を5% FBS加DMEMの中で約 2.5×10^4 細胞/mlに調製し、その2 mlを直径35 mm培養皿に播き、37℃で16時間培養した。0.25 M塩化カルシウム水溶液100 μl/培養皿およびプラスミドDNA(全量2 μg/培養皿)を混合し、室温で10分間静置後、2倍濃度N,N-ビス-(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノ-エタンスルホン酸緩衝液(2×BBS)100 μl/培養皿を加え混合し、室温で15分間静置後、細胞に加えた。3% CO₂下37℃, 6~8時間培養した後、ハンクス液にて洗浄し、5% FBS加DMEMを2 ml加え5% CO₂下37℃で培養した。

Ⅳ. 細胞クローニング

限界希釈法を用いてNPC-KT細胞をクローニングした。NPC-KT細胞を5% FBSのDMEM中で80個細胞/96穴プレートに播いた後、一週間培養した。49個のクローンを回収し、それぞれのクローン細胞のDNA、RNAを抽出した。生体内局所ハイブリダイゼーション(in situ hybridization, ISH)法を用いてEBERsの検出を行った。PCR法を用いてEBV-DNAの内部に存在するEBVw断片を特異的に検出し、ノーサンブロット(Northern blot)でLMP1の検出を行った。

1) ISH

Parkら²³⁾、室野²⁴⁾の方法を準じて行った。分離したNPC-KT細胞クローンをスライドガラス上で、37℃で16時間培養後、

アセトンで細胞を固定し、マイクロプローブシステム(MicroProbe™ system, Fisher Scientific, Pittsburgh, USA)を利用してISHを行った。EBERオリゴヌクレオチド(PNA ISH Detection Kit, DAKO, Glostrup, Denmark)プローブを25倍に希釈して、100℃で4分、80℃で6分、65℃で12分ハイブリダイゼーションを行った。そして50倍希釈した抗FITC抗体を45℃で10分間反応させ、ナフトールAS-MXリン酸(naphtol AS MX phosphate)とファーストレッドTR色素(fast red TR salt)を1:1で混合したNASFRTR (Research Genetics, Huntsville, USA)を使用して45℃で10分間反応させた。核染色はヘマトキシリンにて行った。MDCK (Madin-Darby canine kidney)細胞を陰性コントロールとして使用した。

2) PCR

1×10^5 のNPC-KTクローン細胞を直径6 cmの培養皿に37℃で24時間培養した後、細胞を回収して、全量DNAの抽出を行った。0.2 μg DNAに対して10×PCR緩衝液(100 μM Tris-HCl, PH8.3, 500 μM KCl, 15 μM MgCl₂) 2 μl, 2.5 μM NTP 2 μl, TagDNAポリメラーゼ1.0単位(宝酒造, 京都), EBVwプライマー(5'-CAAAGAGCCAGATCTAAGGCC-3', 5'-CCTAGGTCCGCCATTATGCGC-3') 1 μMを加え、滅菌蒸留水で20 μlにしてPCRを行った。94℃で30秒間の熱変性, 53℃で30秒間アニーリング反応し, 72℃で2分間の伸長反応を30サイクル行った。これにより, 190 bpのEBV-DNAのBamH I-W領域(EBVw)を特異的に増幅させた(EBV-DNAの存在を証明することができる)。細胞β-グロビン(β-globin)DNAをコントロールとして増幅させた。

3) Northern Blot

分離したNPC-KT細胞クローンから全RNAを抽出し, 1.2%アガロース変性ゲルで変性分離した後, ナイロン膜(Hybond-N, Amersham)に移した。³²Pで標識したLMP1プローブを用いて一晩ハイブリダイゼーション反応させ²⁵⁾, Bioimage Analyzer BAS1000 (Fuji Photo Film Co, 東京)で定量した。28Sおよび18SリボソームRNAをコントロールとして使用した。

V. 逆転写PCR法(reverse transcription-PCR, RT-PCR)

1×10^6 のEBV陽性および陰性NPC-KT細胞クローンを直径10 cmの培養皿に37℃で24時間培養した後、細胞を回収して、Trizol reagent (Gibco, BRL)を用いて全RNAの抽出を行った。2 μg RNAを試料として、25 pmolのランダムプライマー(Takara), 4 μlの5×緩衝液, 2 μlの10 μM dNTPs, 10U ReverTraAceを加えて、DEPC処理水で20 μlにした。30℃で10分間, 42℃で60分間の反応によりcDNAを合成した。合成産物1 μlを鋳型としてIL-8プライマー(5'-TTAGATCTGTGATGACTCAGGTTTGCCCTG-3', 5'-GTCCCTAGAA GCTTGTGTGCTCTGCTG-3')を用いてPCR反応を行った。94℃で30秒間の熱変性, 53℃で30秒間のアニーリング反応, 72℃で2分間の伸長反応を1サイクルとして25サイクル行った。グリセロアルデヒドリン酸脱水素酵素(glycerodehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)をコントロールとした。

Ⅵ. ルシフェラーゼレポーターアッセイ (Luciferase Reporter assay)

pGL₃-Basicはホタル(Firefly)ルシフェラーゼレポーターベクターである。IL-8プロモーターをpGL₃-Basicベクターのホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流にあるXho IとHind IIIサイトに挿入した(pGL₃-IL-8)。pGL₃-IL-8からのホタルルシフェラーゼ

の発現を各種のエフェクターのIL-8転写活性化能とした。さらに、トランスフェクション効率の差を補正するため、これらのエフェクターによって転写誘導を受けないウミシイタケ由来のルシフェラーゼ遺伝子 (Renilla luciferase, R/Luc) が組み込まれたインターナルコントロールベクターであるpRL-SV40を同時にトランスフェクトし、ウミシイタケルシフェラーゼ発現量を

内因性コントロールレポーターとして用いた。すなわち、ホタルRLU (relative light unit)/ウミシイタケRLUをきって補正RLUとし、IL-8プロモーター転写誘導能とした。293細胞、C33A細胞そしてEBV陰性NPC-KT細胞クローンを37℃で16時間培養後、真核細胞における発現ベクターであるpcDNA3、pCEP4 (EBNA1を含む)、EBERsの発現プラスミドpCEP4-EBERsおよびLMP1の発現プラスミドpcDNA3-LMP1、それぞれ

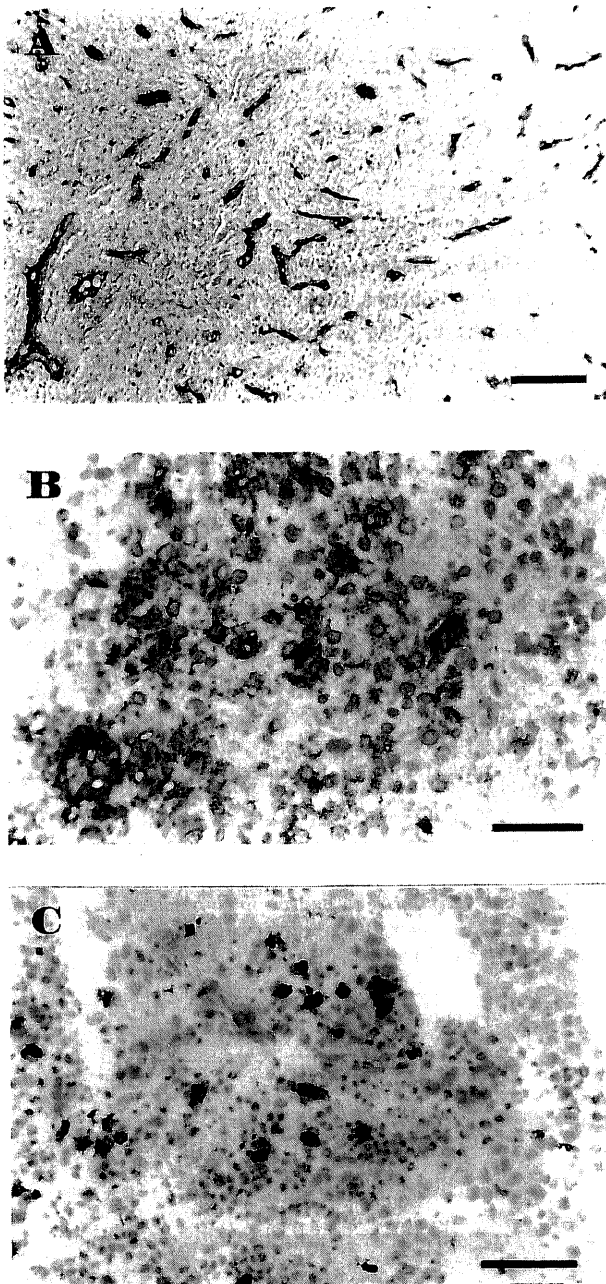


Fig. 1. Photomicrograph of immunohistochemical staining using anti-vWF, anti-LMP1 and anti-IL-8 monoclonal antibodies in the NPC tissues. (A) Microvessels were highlighted by staining endothelial cells and shown to localize at the tumor stroma encircling each of tumor cell nest. (B) LMP1 positive reactions were observed in some of tumor cells with membrane-associated staining patterns. (C) IL-8 positive reactions were observed in the cytoplasm and membrane of tumor cells. The sections were counterstained with methyl green. Scale bar indicated 50 μ m (Original magnification $\times 200$).

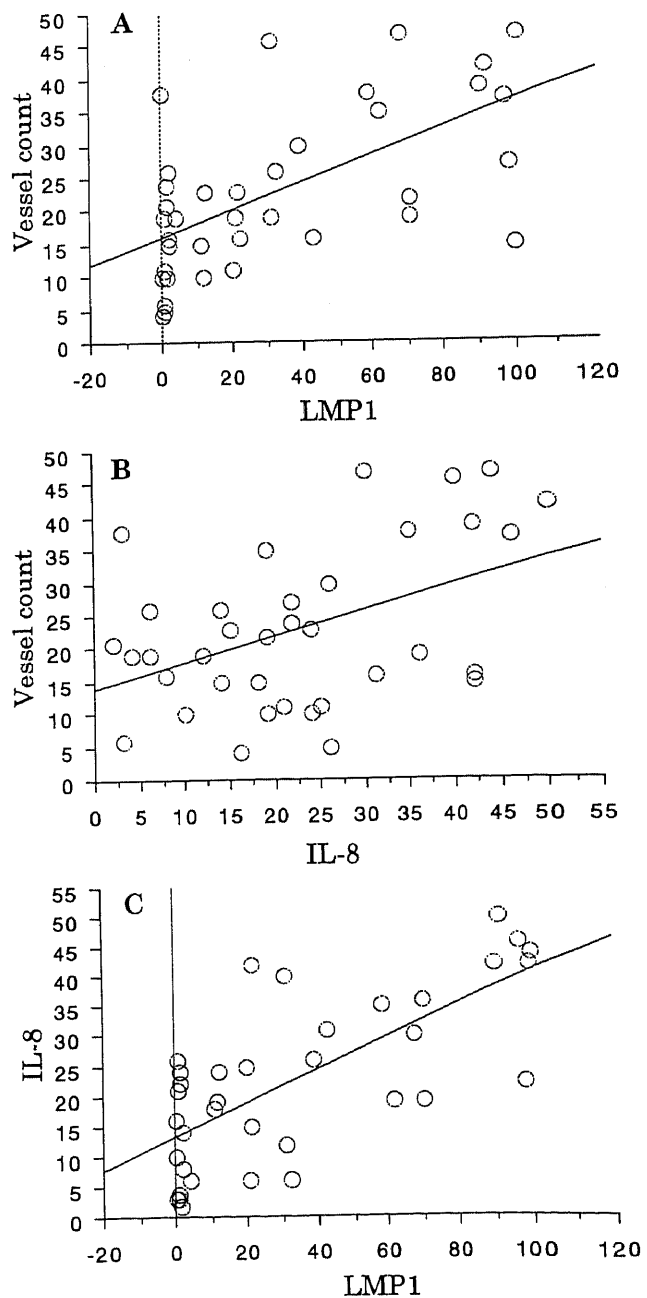


Fig. 2. Correlations between microvessel counts and the expression of LMP-1 ($r = 0.605$, $P < 0.0001$) (A), microvessel counts and the expression of IL-8 ($r = 0.449$, $P = 0.0053$) (B), and the expression of LMP-1 and IL-8 ($r = 0.712$, $P < 0.0001$) (C) in patients with NPC. The expression scores of LMP-1, IL-8 and microvessel counts were plotted and analyzed by Pearson's correlation coefficient analyses.

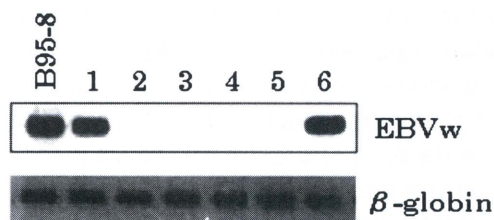
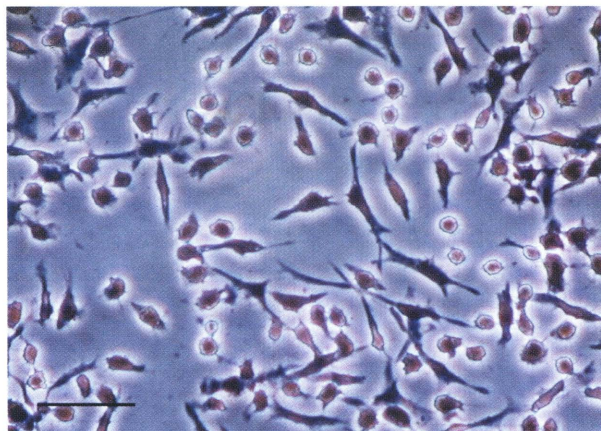


Fig. 3. Detection of EBV-DNA in NPC-KT cell clones using PCR. The cellular DNA were extracted from NPC-KT cell clones, and were amplified with primers for EBVw regions by PCR. Lane 1 to 6, DNA of NPC-KT cell clones. DNA of B95-8 cells is used as a positive control. The EBVw fragment were identified for clone 1 and clone 6. The same DNA samples were amplified with β -globin primers for monitoring the PCR system.

A



B

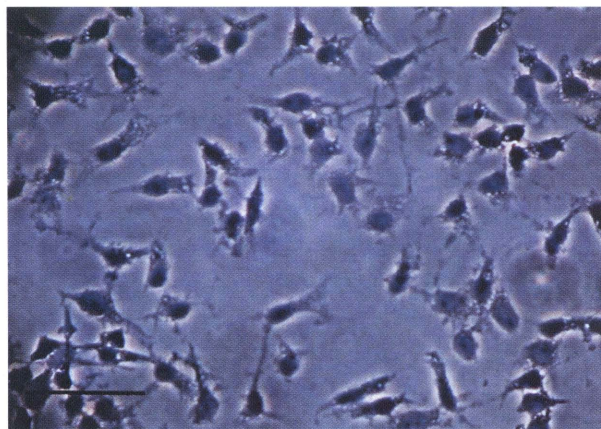


Fig. 4. Photomicrographs of *in situ* hybridization (ISH) with EBVs oligonucleotide probe in the cells of EBV-positive (A) and -negative (B) NPC-KT clones. Positive signal, represented by red color, is located exclusively in the nuclei of almost all the EBV-positive clone cells. Scale bar indicates 50 μ m (Original magnification \times 400).

れを pGL₃-IL-8 および pRL-SV40 プラスミドと共に細胞内に共発現させ、48時間後、デュアルルシフェラーゼレポーターシステム (Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega, USA) を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。1 \times Passive Lysis Buffer (Dual-Luciferase Reporter Assay System に添付される試薬) を加えて細胞を回収した。15000回転で5分間遠心を行い、上清 5 μ l を試料として Luciferase Assay Reagent II 25 μ l を加えてホタル (Firefly) ルシフェラーゼ活性 (RLU) をルミノメーター (EG/G Berthold, Bad Wildbad, Germany) で測定した後、直に Stop & Glo Reagent 25 μ l をサンプルチューブに添加した。ホタルルシフェラーゼが消光すると同時に、ウミシイタケ (Renella) ルシフェラーゼが活性化され、ルミノメーターで測定した。

VII. 統計学的処理

免疫組織検査結果の統計的な解析には、Macintosh personal computer (Apple Computer, Cupertino, Canada) の Stat View 5.0 software (Abacus Concepts, Berkeley, Canada) を利用した。ピアソンの相関係数の検定を行った結果 $P < 0.05$ 以下を有意と判断した。ルシフェラーゼアッセイの結果は有意差が認められたものに対しては、Fisher の PLSD 法にて多重比較検定 (ポストホックテスト) を行った。

成績

I. NPCにおける LMP1, IL-8 の発現と血管新生

37例のNPC標本で抗vWF, LMP1 および IL-8 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。微小血管は主に腫瘍の間質に存在した (図1A)。同じ標本の連続切片で一部の腫瘍細胞膜に LMP1 が陽性であった (図1B)。また、一部の細胞膜および細胞質が IL-8 (図1C) 陽性であった。37例の標本についての微小血管計数と LMP1 の発現率及び IL-8 の発現率との相関を調べた (図2)。LMP1 の発現率と微小血管計数 ($r = 0.605$, $P < 0.0001$), IL-8 の発現率と微小血管計数 ($r = 0.449$, $P = 0.0053$), さらに LMP1 の発現率と IL-8 の発現率 ($r = 0.712$, $P < 0.0001$) との間に有意な相関関係を認めた。以上の結果から LMP1 と IL-8 の発現は、密接に関連すること、そして、共に血管新生と密接に関連することが示唆された。

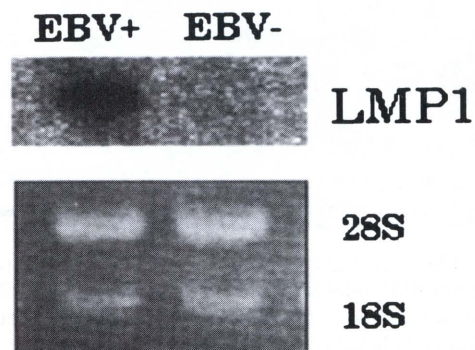


Fig. 5. Northern blot analysis for LMP1 expression in NPC-KT cell clones. Total cellular RNA were extracted from the cells of EBV-positive and -negative NPC-KT clones, and were separated on a 1.2% agarose-6% formaldehyde gel, and stained with ethidium bromide (bottom panel). The blot was hybridized with 32 P-labeled LMP1 probe (top panel).

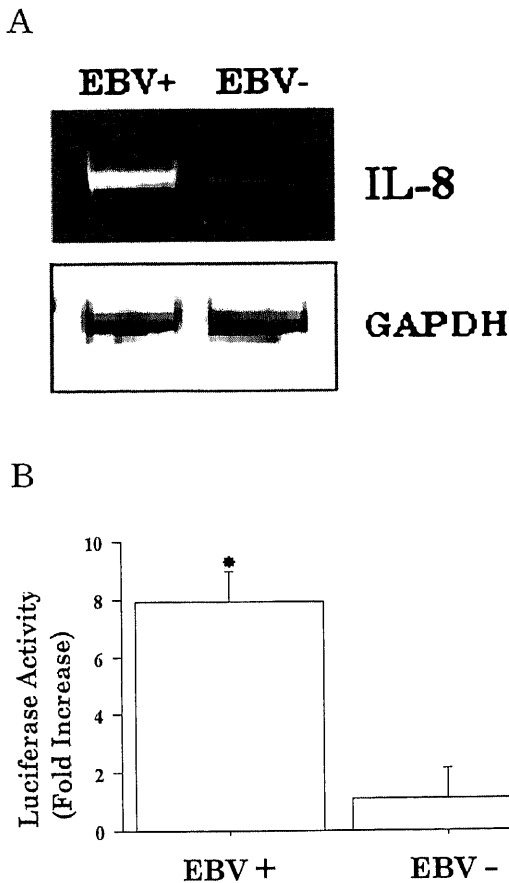


Fig. 6. (A) RT-PCR analysis for IL-8 mRNA expression in EBV-positive and -negative NPC-KT cell clones. The total cellular RNA of the cells of EBV-positive and -negative NPC-KT clones were extracted and subjected to reverse transcription PCR using the primers specific for IL-8 (top panel). GAPDH was used as a control (bottom panel). (B) Activation of IL-8 promoter by EBV. The cells of EBV-positive and -negative NPC-KT clones were cotransfected with pGL₃-IL-8 and pRL-SV40 plasmids, and after 48 h the Luciferase activity (RLU) was quantitated as described in "Materials and Methods." Data from three representative experiments were shown (* $P < 0.01$, ANOVA and post hoc Fisher's PLSD tests).

II. NPC-KT クローンの分離およびEBVゲノムDNAの検出とタンパク質、RNAの発現

限界希釈法を用いてNPC-KT細胞をクローニングし、クローン細胞のDNA、RNAの抽出を行った。PCR法を用いてEBVwを増幅した(図3)。49個クローンのうち12個でEBVwが陽性であった。ISH法を用いてEBERsの検出を行った(図4)。49個クローンのうち10クローンでEBERsが陽性であった。EBVは普遍的に存在するので、単にPCR法では仮陽性の恐れがある。また、単にISH法ではコピー数の差で検出できない可能性もあるので、両方ともに陽性の場合にEBV-DNA陽性と判断した。それに基づいて10株のEBV-DNAを持つNPC-KT細胞クローンを分離した。EBV陽性および陰性クローンから抽出したRNAを用いてノーサンブロットを行ったところ、EBV陽性クローンにおいて特異的にLMP1が検出された(図5)。

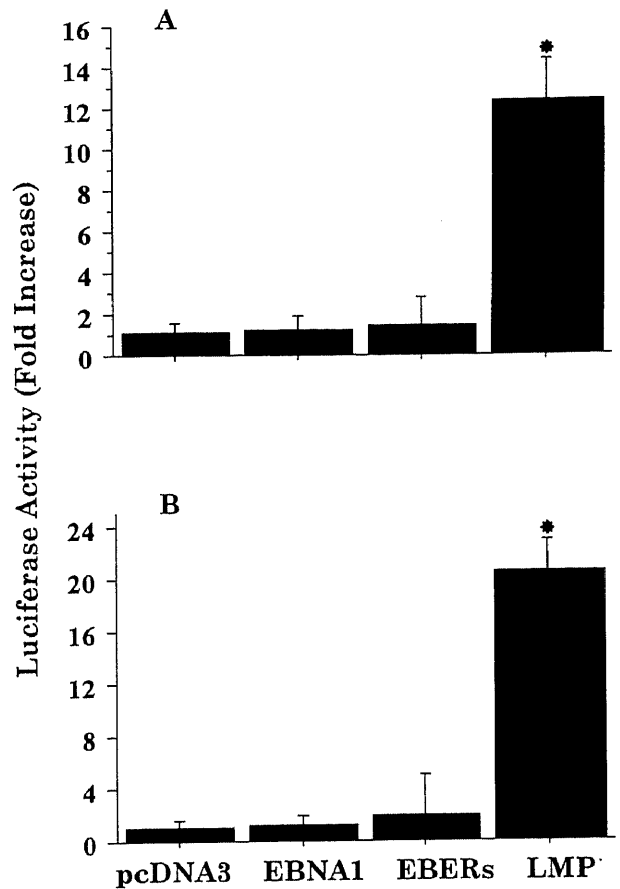


Fig. 7. LMP1 induces IL-8 promoter activity. 293 cells (A) and EBV-negative NPC-KT clone cells (B) were transiently cotransfected with pcDNA3, pCEP4 (EBNA1), pCEP4-EBERs or pcDNA3-LMP1 plasmids in the presence of pGL₃-IL-8 and pSV40 plasmids. After 48 h the luciferase activity was quantitated as described in "Materials and Methods." Data from three representative experiments were shown (* $P < 0.01$, ANOVA and post hoc Fisher's PLSD tests).

III. IL-8 転写レベルでの発現はEBVの存在により活性化される

EBV陽性および陰性NPC-KT細胞クローンのRNA抽出を行い、IL-8 mRNAの発現の違いをRT-PCRにて調べた。EBV陽性クローンでのIL-8 mRNAの発現はEBV陰性クローンより高いことが明らかになった(図6A)。EBV陽性クローンあるいは陰性クローンにpGL₃-IL-8プラスミドを発現させ、ルシフェラーゼアッセイで調べたところ、EBV陽性クローンのIL-8プロモーターの活性は陰性クローンに比較して有意な増加(8±1.2倍、 $P < 0.01$)が認められた(図6B)。すなわち、IL-8転写レベルでの発現はEBVの存在により誘導されることが判明した。

IV. IL-8 プロモーターがLMP1により活性化される

EBV陽性NPC-KT細胞クローンではEBNA1, LMP1, EBERsが陽性であることがわかった。どの遺伝子産物がIL-8プロモーターの活性化に関与するのかを調べるため、pcDNA3ベクター、pCEP4ベクター(EBNA1を含む)、LMP1およびEBERs発現ベクターそれぞれをpGL₃-Basic及びpRL-SV40と共にEBV陰性

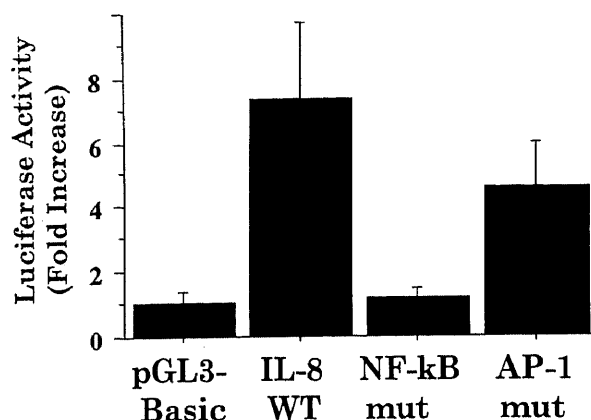


Fig. 8. Identification of responsive elements in the promoter region of IL-8 gene by LMP1. The effect of wild type (WT) and site-mutated IL-8 promoters on the induction of luciferase activity (means of triplicate samples; bar, SD) were determined by transfection of C33A cells with the luciferase expression vectors containing the promoter region of IL-8 gene without mutation (pGL3-IL-8) or with mutation at NF- κ B (NF- κ Bmut) or AP-1 (AP-1mut), in the presence of pcDNA3-LMP1 as described in "Materials and Methods."

293細胞あるいはEBV陰性NPC-KT細胞クローンに導入し、ルシフェラーゼアッセイで調べたところ、293細胞ではLMP1によりIL-8プロモーターの活性がpcDNA3ベクターコントロールの12倍 (12 ± 2.2 倍, $P < 0.01$) (図7A), 同じくEBV陰性NPC-KT細胞クローンでは20倍 (20 ± 2.4 倍, $P < 0.01$) に上昇した (図7B). 一方, pcDNA3ベクター, EBNA1を含むpCEP4ベクターあるいはEBERs発現ベクターを導入した場合はIL-8プロモーター活性化を誘導しなかった (図7). 以上の結果から, EBVによるIL-8プロモーターの活性化にはLMP1が関与することが判明した.

V. LMP1はNF- κ B (nuclear factor kappa B) 結合領域を介してIL-8プロモーターを活性化する

IL-8プロモーターおよびその変異体発現プラスミドをLMP1発現プラスミドと共にC33A細胞に形質導入して, NF- κ BおよびAP-1結合領域の変異がLMP1によるIL-8プロモーター活性化におよぼす影響についてルシフェラーゼアッセイを用いて検討した. その結果は, NF- κ B領域の変異したIL-8プロモーターの活性化は完全に阻害され, AP-1領域の変異したIL-8プロモーターの活性化は部分的に (40%) 阻害された (図8). この結果からIL-8プロモーター上流にあるNF- κ B結合領域はLMP1によるIL-8転写促進に必須であること, AP-1結合領域も部分的に転写促進に働くことが証明された.

考 察

本実験はEBVの存在が細胞のIL-8発現に対して促進的に働くこと, さらに, EBV遺伝子産物のうち, LMP1の発現がIL-8の転写を誘導することを明らかにした.

IL-8はラット角膜での血管新生を誘導する重要な血管新生促進因子である²⁹. IL-8は黒色腫, 卵巣癌, 前立腺癌および胃癌の浸潤転移能と相関する²⁷⁻³⁰. IL-8だけではなく, VEGF, 肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor), マトリックスメタロ

プロテアーゼなどの血管新生促進因子が相乗的に作用して血管新生を促進すると考えられている.

LMP1はラット培養繊維芽細胞株に腫瘍原性形質転換を引き起こし³¹, 上皮系細胞MDCK (Madin-Darby canine kidney) を形質転換し, 運動能を亢進させる⁵. LMP1は, そのほかにも上皮細胞の分化を抑制し, ケラチノサイトの形態変化やケラチン遺伝子発現変化を引き起こして上皮細胞の増殖, 分化に影響を与える^{32,33}. 以上の報告からも, LMP1が上皮系癌であるNPCの発癌に強く関連すると考えられている. さらにLMP1はBcl-2やA20の産生増加による抗アポトーシス作用³⁴⁻³⁶ p38 MAPK (mitogen activated protein kinase) を介したIL-8およびIL-6誘導³⁷, NF- κ BとAP-1を介したMMP9誘導^{38,39}など, LMP1発現細胞およびその周辺組織に多様な影響を与える. このようにLMP1は多様な細胞内シグナルを活性化するが, 今回の実験では, IL-8の誘導にはIL-8プロモーター領域のNF- κ B結合配列が必須であることから, LMP1によるIL-8誘導にNF- κ Bの活性化が重要な働きをしていることが示唆された.

LMP1は6つの膜貫通膜ドメインをもった62 kDa膜蛋白質である. そのN末端の24残基およびC末端の約200残基のアミノ酸は細胞質側に存在している. この細胞質C末端部位は2種類のシグナルドメインを含む. このC末端の活性領域 (COOH-terminal activation region, CTAR)-1および (CTAR)-2の二つはNF- κ Bの活性化部位である⁴⁰⁻⁴²ことから, IL-8の発現の誘導にはいずれの領域も関与することが示唆される.

本実験ではEBV遺伝子産物のうちEBNA1, EBERsはIL-8の発現に直接関与することが認められなかった. このことはEBERsの発現が微小血管数とは相関しなかったという脇坂の報告と一致した. 核内小RNAであるEBERsのNPCに対する役割は不明であり, 今後の解明が期待される. 今回LMP2の発現については検討していない. LMP2A, 2BはNPCに発現している遺伝子産物である. LMP2による上皮系細胞形質転換について言及した報告は少なく, 生体内での役割については不明な点が多い. しかし, 近年, チロシンキナーゼ活性があり, B細胞の増殖を促進し, 細胞を形質転換する重要なEBV遺伝子であることが報告されている⁴³. したがって, 上皮系腫瘍であるNPCにおいても何らかの機能を有している可能性がある.

癌ウイルスであるEBVはNPCの発癌に深く関与し, LMP1が主に悪性形質を与えると考えられている. そして, 本研究はLMP1による癌の増殖, 浸潤, 転移を促進するメカニズムの一つとして, IL-8転写誘導による血管新生促進があること, そして, そのシグナル伝達因子としてNF- κ Bが重要な役目を果たすことを示唆した. LMP1によるMMP9誘導はNF- κ B阻害因子であるアスピリンやI- κ Bによって阻害されることがわかっている. これらの因子によって, LMP1によるIL-8誘導を制御できる可能性がある. 今後, 分離したEBV陽性と陰性のNPC-KT細胞クローンを利用し, 血管新生誘導機構の解明やEBV遺伝子発現細胞の生物学的特性, EBV遺伝子の機能などについて更に検討することが望まれる.

結 論

NPCにおける血管新生誘導機構に対するEBV遺伝子の関与について検討した.

1. 免疫組織化学法にてNPCにおけるLMP1, IL-8の発現および微小血管数との間に有意な相関関係が認められた.

2. EBV陽性のNPC-KT細胞クローンではEBV陰性クローンと比較してIL-8 mRNAの発現は亢進していた。

3. EBV遺伝子産物のうちEBNA1, EBERsはIL-8プロモーターからの転写誘導に影響を与えないが, LMP1はIL-8プロモーターを活性化した。

4. LMP1によるIL-8誘導にはIL-8プロモーターの上流にあるNF- κ B結合領域が必要不可欠である。

以上の結果から, EBV遺伝子産物であるLMP1によるシグナル伝達において, NF- κ B, AP-1の活性化によりIL-8遺伝子からの転写が誘導され, その結果としてNPCでの血管新生を引き起こすことが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導と御校閲を賜りました恩師古川初教授に深甚なる謝意を捧げます。また終始直接御指導を賜りました恩師佐藤博教授(金沢大学がん研究所細胞機能統御部門)に心から感謝いたします。本研究に終始指導を賜りました吉崎智一講師に感謝を致します。さらに, 御協力と御援助をいただきました金沢大学耳鼻咽喉科学教室の諸先生方, 金沢大学がん研究所細胞機能統御部門の皆様にも深く感謝をいたします。本研究に御援助くださいました国際耳鼻咽喉科振興会に感謝いたします。

文 献

- 1) Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1: 702-703, 1964
- 2) Old LJ, Boyse EA, Oettgen HE, Harven E, Geering G, Williamson B, Clifford P. Precipitating antibody in human serum to an antigen present in cultured Burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 56: 1699-1704, 1966
- 3) zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G, Henle W, Henle G, Clifford P, Santesson L. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* 228: 1056-1058, 1970
- 4) Fahraeus R, Chen W, Trivedi P, Klein G, Obrink B. Decreased expression of E-cadherin and increased invasive capacity in EBV-LMP-transfected human epithelial and murine adenocarcinoma cells. *Int J Cancer* 52: 834-838, 1992
- 5) Kim KR, Yoshizaki T, Miyamori H, Hasegawa K, Horikawa T, Furukawa M, Harada S, Seiki M, Sato H. Transformation of Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) induces expression of Ets1 and invasive growth. *Oncogene* 19: 1764-1771, 2000
- 6) Yoshizaki T, Sato H, Furukawa M, Pagano J. The expression of matrix metalloproteinase 9 is enhanced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3621-3626, 1998
- 7) Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182-1186, 1971
- 8) Lyng H, Skretting A, Rofstad EK. Blood flow in six human melanoma xenograft lines with different growth characteristics. *Cancer Res* 52: 584-592, 1992
- 9) Srivastava A, Laidler P, Hughes LE, Woodcock J, Shedden EJ. Neovascularization in human cutaneous melanoma: a quantitative morphological and Doppler ultrasound study. *Eur J Cancer Clin Oncol* 22: 1205-1209, 1986
- 10) Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastases-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324: 1-8, 1991
- 11) Samoto K, Ikezaki K, Ono M, Shono T, Kohno K, Kuwano M, Fukui M. Expression of vascular endothelial growth factor and its possible relation with neovascularization in human brain tumors. *Cancer Res* 55: 1189-1193, 1995
- 12) Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Dvorack HF, Brown LF. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 87: 1237-1245, 1995
- 13) Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 55: 3964-3968, 1995
- 14) Folkman J, Klagsbrum M. Angiogenic factors. *Science* 235: 442-447, 1987
- 15) 脇坂 尚宏. 上咽頭癌におけるEpstein-Barrウイルス関連因子および血管新生因子の発現に関する研究. *十全医会誌* 106: 105-115, 1997
- 16) Eliopoulos AG, Gallagher NJ, Blake SM, Dawson CW, Young LS. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J Biol Chem* 274(23): 16085-16096, 1999
- 17) Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580, 1981
- 18) Horokawa T, Yoshizaki T, Sheen TS, Lee SY, Furukawa M. Association of latent membrane protein 1 and matrix metalloproteinase 9 with metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer (Phila)* 89: 715-723, 2000
- 19) Wakisaka N, Wen QH, Yoshizaki T, Nishimura T, Furukawa M, Kawahara E, Nakanishi I. Association of vascular endothelial growth factor expression with angiogenesis and lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope* 109: 810-814, 1999
- 20) Roychowdhury DF, Tseng A, Fu KK, Weinberg V, Weidner N. New prognostic factor in nasopharyngeal carcinoma. Tumor angiogenesis and C-erbB2 expression. *Cancer* 77: 1419-1426, 1996
- 21) Takimoto T, Kamide M, Umeda R. Establishment of Epstein-Barr virus (EBV)-associated nuclear antigen (EBNA)-positive nasopharyngeal carcinoma hybrid cell line (NPC-KT). *Arch Otorhinolaryngol* 239(1): 87-92, 1984
- 22) Mukaida N, Shiroo M, Matsushima K. Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8. *J Immunol* 143: 1366-1371, 1989
- 23) Park CS, Manahan LJ, Brigati DJ. Automated molecular pathology: one hour in situ DNA hybridization. *J Histochemol* 14: 219-229, 1991
- 24) 室野 重之. 上咽頭癌におけるEpstein-Barrウイルス遺伝

子産物およびP53蛋白, bcl-2蛋白の発現に関する研究. 十全医会誌 105: 187-202, 1996

25) Kadono Y, Okada Y, Namiki M, Seiki M, Sato H. Transformation of epithelial Madin-Darby canine kidney cells with p60 (v-src) induces expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and invasiveness. *Cancer Res* 58(10): 2240-2244, 1998

26) Matsushima K, Oppenheim J. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL-8 and TNF. *Cytokines* 1: 2-12, 1989

27) Yoneda J, Kuniyasu H, Crispen MA, Price JE, Bucana CD, Fidler IJ. Expression of angiogenesis-related genes and progression of human ovarian carcinomas in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 90: 447-454, 1998

28) Greene GF, Kitadai Y, Pettaway CA, von Eschenbach AC, Bucana CD, Fidler IJ. Correlation of metastasis-related gene expression with metastatic potential in human prostate carcinoma cells implanted in nude mice using an in situ messenger RNA hybridization technique. *Am J Pathol* 150: 1571-1582, 1997

29) Ferrer FA, Miller LJ, Andrawis RI, Kurtzman SH, Albertsen PC, Laudone VP, Kreutzer DL. Angiogenesis and prostate cancer: in vivo and in vitro expression of angiogenesis factors by prostate cancer cells. *Urology* 51: 161-167, 1998

30) Kitadai Y, Haruma K, Sumii K, Yamamoto S, Ue T, Yokozaki H, Yasui W, Ohmoto Y, Kajiyama G, Fidler IJ, Tahara E. Expression of interleukin-8 correlates with vascularity in human gastric carcinomas. *Am J Pathol* 152: 93-100, 1998

31) Wang D, Liebowitz D, Kieff E. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* 43: 831-840, 1985

32) Dawson CW, Rickinson AB, Young LS. Epstein-Barr virus latent membrane protein inhibits human epithelial cell differentiation. *Nature* 344(6268): 777-780, 1990

33) Fahraeus R, Rymo L, Rhim JS, Klein G. Morphological transformation of human keratinocytes expressing the LMP gene of Epstein-Barr virus. *Nature* 345(6274): 447-449, 1990

34) Henderson S, Rowe M, Gregory C, Croom-Carter D, Wang F, Longnecker R, Kieff E, Rickinson A. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 65(7): 1107-1115, 1991

35) Laherty CD, Hu HM, Opipari AW, Wang F, Dixit VM. The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J Biol Chem* 267(34): 24157-24160, 1992

36) Rowe M, Peng-Pilon M, Huen DS, Hardy R, Croom-Carter D, Lundgren E, Rickinson AB. Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell-specific response that is delayed relative to NF-kappa B activation and to induction of cell surface markers. *J Virol* 68(9): 5602-5612, 1994

37) Eliopoulos AG, Gallagher NJ, Blake SM, Dawson CW, Young LS. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J Biol Chem* 274(23): 16085-16096, 1999

38) Cancer Murono S, Yoshizaki T, Sato H, Takeshita H, Furukawa M, Pagano J S. Aspirin inhibits tumor cell invasiveness induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 through suppression of matrix metalloproteinase-9 expression. *Cancer Res* 60: 2555-2561, 2000

39) Takeshita H, Yoshizaki T, Miller WE, Sato H, Furukawa M, Pagano J S, Raab-Traub N. Matrix metalloproteinase 9 expression is induced by Epstein-Barr 1 C-terminal activation region 1 and 2. *J Virol* 73: 5548-5555, 1999

40) Mosialos G, Birkenbach M, Yalamanchili R, VanArsdale T, Ware C, Kieff E. The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 80: 389-399, 1995

41) Devergne O, Hatzivassiliou E, Izumi KM, Kaye KM, Kleijnen MF, Kieff E, Mosialos G. Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 16: 7098-7108, 1996

42) Izumi KM, Kieff ED. The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-B. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12592-12597, 1997

43) Brooks LA, Lear AL, Young LS, Rickinson AB. Transcripts from the Epstein-Barr virus *Bam*HI A fragment are detectable in all three forms of virus latency. *J Virol* 67(6): 3182-3190, 1993

Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein-1 (LMP1) contributes to Angiogenesis through expression of Interleukin-8 in NPC Qingchun Ren, Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Jusen Med Soc., **111**, 152 — 161 (2002)

Key words angiogenesis, Epstein-Barr virus related genes, interleukin-8, NPC-KT, nasopharyngeal carcinoma

Abstract

The present study we investigate how Epstein-Barr virus (EBV) -related genes associated with angiogenesis in nasopharyngeal carcinoma (NPC). The microvessels were highlighted by staining endothelial cells with von Willebrand factor (vWF) in 37 primary NPCs using immunohistochemical techniques, and were counted on light microscopy, as an index of angiogenesis in NPCs. The expression of LMP1 and IL-8 were also examined and defined as the expression score for statistic analysis. We have found that Microvessel counts correlated significantly with LMP1 expression ($r = 0.605$, $P < 0.0001$), and IL-8 expression ($r = 0.449$, $P = 0.0053$), and LMP1 expression also correlated significantly with IL-8 expression ($r = 0.712$, $P < 0.0001$). Furthermore, the EBV-positive clones and -negative clones were isolated from NPC model cell line NPC-KT cells using limiting dilution method to compare the expression of IL-8 mRNA. We demonstrate that the expression of IL-8 mRNA in EBV-positive clones were higher than in EBV-negative clones by RT-PCR. The EBV-positive clones and -negative clones were transiently transfected with IL-8 promoter luciferase reporter plasmid (pGL₃-IL-8), increased IL-8 promoter activity (8 ± 1.2 -fold, $P < 0.01$) in EBV-positive clones were observed by luciferase reporter assay. To determine which of EBV-related genes affects the IL-8 promoter activity, pcDNA3 expression vector, EBNA1, EBERs or LMP1 expression plasmid were cotransfected in 293 cells and EBV-negative NPC-KT cells together with pGL₃-IL-8, respectively. LMP1 expression was found to induce IL-8 promoter activity significantly in both 293 (12 ± 2.2 -fold, $P < 0.01$) and EBV-negative NPC-KT cells (20 ± 2.4 -fold, $P < 0.01$) compared to that in the pcDNA3-transfected cells. However, pcDNA3 vector and the expression of EBNA1 and EBERs did not affect IL-8 promoter activity. In addition, the wild type (WT) IL-8 promoter, or IL-8 promoters with mutated nuclear factor kappaB (NF- κ B) responsive element and mutated activator protein-1 (AP-1) responsive element, were transfected in C33A cells together with LMP1 expression plasmid. The IL-8 promoter activity by LMP1 was completely abolished by the mutation of NF- κ B responsive element, and was partially abolished by the mutation of AP-1 responsive element. These results suggested that induction of IL-8 by LMP-1 is mainly mediated by NF- κ B, and contributes to angiogenesis in NPC.